

## 1) Ectodinがラット象牙芽細胞様細胞の分化に及ぼす影響について

○中島 宗隆

(奥羽大・歯・保存修復学)

【目 的】 Ectodin は SOST ドメインを有する分泌型糖蛋白質であり、Wnt シグナルを阻害するアンタゴニストとして知られている。歯の発生において歯冠の形態形成や咬頭の数、歯の数を決定する因子として重要な働きをしている。一方、Wnt シグナルは象牙芽細胞の分化調節に重要な役割を果たしていることが報告されており、dentinogenesis の調節因子として注目されている。

この Wnt シグナルのアンタゴニストである ectodin が Wnt シグナルに作用して dentinogenesis に関与することは十分に考えられるが、これまでに象牙芽細胞の分化や機能に対して ectodin と Wnt シグナルの関係を調べた報告はみられないのが現状である。本研究ではラット切歯から分離した培養歯髓細胞を利用して ectodin と Wnt シグナルの関係が dentinogenesis に対してどのように作用しているかを調べることを目的とした。

【材料と方法】 SD ラットの顎切歯から酵素分離法によって歯髓培養細胞を分離した。これらの細胞を 5, 10, 15, 20 日間培養し実験に使用した。これらの培養細胞に LiCl を添加し Wnt シグナル活性化状態にし、象牙芽細胞への分化への影響を調べた。また、ectodin の siRNA を作成しノックダウンを行い分化、機能に対する影響を調べた。象牙芽細胞の分化指標として、ALP, Osteocalcin, DSPP の mRNA 発現をリアルタイム PCR にて調べた。また、ectodin の mRNA 発現も合わせて調べた。形態的には ALP 染色と von Kossa 染色を行い象牙質様石灰化結節の形成を調べた。

【結果と考察】 培養歯髓細胞に LiCl を添加するとその分化が抑制され、ALP, Osteocalcin, DSPP の mRNA の発現が抑制され、象牙質様石灰化結節の形成も抑制された。しかし、ectodin の mRNA 発現が促進され、Wnt シグナルに対するネガティブフィードバック機構があることが示唆された。さらに ectodin の siRNA によるノック

ダウンの結果、培養歯髓細胞の DSPP の mRNA 発現が抑制され象牙質様石灰化結節の形成が抑制された。これらの結果から Wnt シグナルは象牙芽細胞の分化を抑制しており、このシグナルを ectodin が阻害することによって象牙芽細胞の分化を調節していることが示唆された。

【結 論】 Ectodin は象牙芽細胞の分化調節因子である。

## 2) 酸性細胞外pHは、ルイス肺癌モデルにおける上皮間葉系移行を促進する

○鈴木 厚子

(奥羽大・大学院・口腔生理・生化)

【緒 言】 近年、がん細胞の浸潤や転移の過程には、上皮の性質から間葉系の性質に変化するという上皮間葉系移行 (EMT) が注目されている。これまでに Kato ら (JBC, 1992) は、酸性細胞外 pH によりメラノーマ細胞が EMT 様に変化することを見いだしている。本研究では、carcinoma モデルとしてマウスルイス肺癌 (LLC) 細胞株を用いて、酸性細胞外 pH が EMT を誘導することを検証した。

【方 法】 LLC 細胞より実験的転移を繰り返すことにより樹立した低転移株と高転移株を本研究に用いた。細胞は通法に従い、DMEM と F12 を 1 対 1 に混合した培地に 15mM HEPES と 4mM リン酸を添加し、重炭酸ナトリウム 1g/L と通常より添加量を減らして加えさらに 10% 牛胎児血清を添加し 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。pH の調整は塩酸と水酸化ナトリウムにて行った。EMT マーカー遺伝子の発現は、定量的 PCR により決定し、遊走および浸潤活性はそれぞれ、wound healing assay および Matrigel® を介し Boyden chamber assay により分析した。

### 【結 果】

- (1) pH6.8 で LLCm1 細胞, LLCm4 細胞を培養することで、以下が確認できた。
  - 1) LLCm1 細胞の形態は線維芽細胞様に変化し、高転移株と類似の形態を示した。
  - 2) 細胞運動能が向上した。
  - 3) E-cadherin 発現が減少し、Vimentin の発現を誘導した。